

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-078756  
 (43)Date of publication of application : 22.03.1994

(51)Int.Cl.

C12N 1/20  
 A61K 37/20  
 A61K 37/20  
 A61K 37/20  
 A61K 37/20  
 C08B 37/00  
 C12P 19/04  
 // (C12N 1/20  
 C12R 1:425 )  
 (C12N 1/20  
 C12R 1:01 )  
 (C12P 19/04  
 C12R 1:01 )

21)Application number : 03-291845

(71)Applicant : CHIBA SEIFUN KK

MIZUNO DENICHI  
 SOMA GENICHIRO

22)Date of filing : 20.08.1991

(72)Inventor : SOMA GENICHIRO  
 YOSHIMURA ATSUSHI  
 TSUKIOKA DAISUKE  
 MIZUNO DENICHI  
 OSHIMA HARUYUKI

0)Priority

Priority number : 02218599  
 02312932

Priority date : 20.08.1990  
 20.11.1990

Priority country : JP  
 JP

4) MICROORGANISM CAPABLE OF PRODUCING LPS, LPS AND MEDICINE AND ANIMAL MEDICINE CONTAINING LPS

7)Abstract:

**PURPOSE:** To provide an immunological function activator, an analgesic agent, an antiabstinence agent and an animal medicine thereof administrable by any of oral, percutaneous administration and injection, lipopolysaccharides(LPSs) which are an active ingredient thereof and a bacterium capable of producing the LPSs.

**INSTITUTION:** To objective three kinds of LPSs having the following physical properties is provided: (1) LPS1:  $5,000 \pm 1,000$  primary molecular weight [measured by the sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) method]; the number of phosphorus atoms:  $2 \pm 1$ /molecular weight 5,000; the number of hexosamine:  $9 \pm 1$ /molecular weight 5,000 and number of 2-keto-3-deoxyoctonate (KDO):  $24 \pm 1$ /molecular weight 5,000; (2) LPS2:  $6,500 \pm$

2,500 primary molecular weight (measured by the SDS-PAGE method); the number of phosphorus atoms: 1-2/molecular weight 5,000; the number of hexosamine:  $7 \pm 1$ /molecular weight 5,000 and the number of KDO: 1-2/molecular weight 5,000 and (3) LPS3:  $6,500 \pm 2,500$  primary molecular weight (measured by the SDS-PAGE method); the number of phosphorus atoms:  $2 \pm 1$ /molecular weight 5,000; the number of hexosamine:  $5 \pm 1$ /molecular weight 5,000 and the number of KDO: 2  $\pm 1$ /molecular weight 5,000.

---

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination] 19.11.1992

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-78756

(43)公開日 平成6年(1994)3月22日

(51)Int.Cl. <sup>1</sup>	識別記号	府内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 N 1/20	A	7236-4B		
	E	7236-4B		
A 81 K 37/20	AAH			
	ABD	8314-4C		
	ADR			

審査請求 有 請求項の数12(全 16 頁) 最終頁に統く

(21)出願番号	特願平3-291845	(71)出願人	000199441 千葉製粉株式会社 千葉県千葉市美浜区新港17番地
(22)出願日	平成3年(1991)8月20日	(71)出願人	000193553 水野 伝一 神奈川県鎌倉市岡本18
(31)優先権主張番号	特願平2-218599	(71)出願人	390025210 柳 源一郎 東京都世田谷区東玉川1-10-21
(32)優先日	平2(1990)8月20日	(72)発明者	柳 源一郎 東京都世田谷区東玉川1-10-21
(33)優先権主張国	日本 (JP)	(72)発明者	吉村 淳 千葉県千葉市稲毛3-28-7
(31)優先権主張番号	特願平2-312932		
(32)優先日	平2(1990)11月20日		
(33)優先権主張国	日本 (JP)		

最終頁に統く

(54)【発明の名称】 LPS產生菌、LPS、LPSを含む医薬及び動物薬

(57)【要約】 (修正有)

【目的】 経口、経皮、注射のいずれでも投与可能な新規な免疫機能活性化剤、鎮痛剤、抗禁断症状剤及びそれらの動物薬、それらの活性成分である新規LPS、及びそれらLPSを產生する新規な細菌を提供する。

【構成】 次の物性を有する3種のLPSを特徴とする。  
① LPS1 主要分子量:  $5,000 \pm 1,000$  (SDS-PAGE法)、リン数:  $2 \pm 1/\text{分子量}$  5,000、ヘキソサミン数:  $9 \pm 1/\text{分子量} 5,000$ 、KDO数:  $2 \pm 1/\text{分子量} 5,000$ 、  
② LPS2 主要分子量:  $6,500 \pm 2,500$  (SDS-PAGE法)、リン数:  $1 \sim 2/\text{分子量} 5,000$ 、ヘキソサミン数:  $7 \pm 1/\text{分子量} 5,000$ 、KDO数:  $1 \sim 2/\text{分子量} 5,000$ 、  
③ LPS3 主要分子量:  $6,500 \pm 2,500$  (SDS-PAGE法)、リン数:  $2 \pm 1/\text{分子量} 5,000$ 、ヘキソサミン数:  $5 \pm 1/\text{分子量} 5,000$ 、KDO数:  $2 \pm 1/\text{分子量} 5,000$

## 〔特許請求の範囲〕

〔請求項1〕 次の性質を有するLPS産生グラム陰性短桿菌。

- (a) 形態
- ①短桿状
- ②運動性なし
- ③グラム染色性: -

(b) 生育状態

①標準寒天培地: 黄～クリーム色で丸形の不透明なコロニーを形成する。

②SS寒天培地: 白色で半透明なコロニーを形成する。

③TSI寒天培地: 斜面部での変化はないが、高層部は黄変する。ガスを生成する。

(c) 生理的性質

①フォーグス・プロスカウエル反応: +

②インドールの生成: -

③硫化水素の生成: -

④ケン酸の利用: +

⑤ウレアーゼ: -

⑥オキシダーゼ: -

⑦O-Fテスト: +

(d) 炭素源の利用性

①ラクトース: +

②アドニット: -

③ラムノース: +

④マンニット: +

⑤エスクリン: +

⑥イノシット: -

⑦ソルビット: +

⑧アラビノース: +

⑨ラフィノース: +

▲10▼ショクロース: +

(e) その他

①リジンの脱炭酸反応: -

②マロン酸の利用: -

③アルギニンの分解: -

④フェニルアラニンの脱アミノ化反応: -

⑤オルニチンの脱炭酸反応: -

【請求項2】 次の性質を有するLPS産生グラム陰性短桿菌。

(a) 形態

①短桿状

②運動性なし

③グラム染色性: -

(b) 生育状態

①標準寒天培地: クリーム色で不透明なコロニーを形成する。

②SS寒天培地: 赤色で不透明なコロニーを形成する。

③TSI寒天培地: 斜面部での変化はないが、高層部は黄変する。ガスを生成する。

## (c) 生理的性質

①フォーグス・プロスカウエル反応: +

②インドールの生成: -

③硫化水素の生成: -

④ケン酸の利用: +

⑤ウレアーゼ: -

⑥オキシダーゼ: -

⑦O-F テスト: +

(d) 炭素源の利用性

①ラクトース: +

②アドニット: -

③ラムノース: +

④マンニット: +

⑤エスクリン: +

⑥イノシット: -

⑦ソルビット: +

⑧アラビノース: +

⑨ラフィノース: +

▲10▼ショクロース: +

## (e) その他

①リジンの脱炭酸反応: -

②マロン酸の利用: +

③アルギニンの分解: +

④フェニルアラニンの脱アミノ化反応: -

⑤オルニチンの脱炭酸反応: +

【請求項3】 次の性質を有するLPS産生グラム陰性短桿菌。

(a) 形態

①短桿状

②運動性なし

③グラム染色性: -

(b) 生育状態

①標準寒天培地: 黄色で丸形の半透明なコロニーを形成する。

②SS寒天培地: コロニーを形成しない。

③TSI寒天培地: 斜面部での変化はないが、高層部は黄変する。ガスを生成しない。

(c) 生理的性質

①フォーグス・プロスカウエル反応: +

②インドールの生成: -

③硫化水素の生成: -

④ケン酸の利用: +

⑤ウレアーゼ: -

⑥オキシダーゼ: -

⑦O-F テスト: +

(d) 炭素源の利用性

①ラクトース: +

②アドニット: -

③ラムノース: +

④マンニット: +

⑤エスクリン：+

⑥イノシット：-

⑦ソルピット：+

⑧アラビノース：+

⑨ラフィノース：-

▲10▼ショクロース：+

(e) その他

①リジンの脱炭酸反応：-

②マロン酸の利用：+

③アルギニンの分解：-

④フェニルアラニンの脱アミノ化反応：-

⑤オルニチンの脱炭酸反応：-

【請求項4】 次の物性を示す、請求項1記載の細菌に由来するLPS。

主要分子量： $5,000 \pm 1,000$  (SDS-PAGE法による)

リン数： $2 \pm 1$  / 分子量 $5,000$

ヘキソサミン数： $9 \pm 1$  / 分子量 $5,000$

KDO数： $2 \pm 1$  / 分子量 $5,000$

【請求項5】 次の物性を示す、請求項2記載の細菌に由来するLPS。

主要分子量： $6,500 \pm 2,500$  (SDS-PAGE法による)

リン数： $1 \sim 2$  / 分子量 $5,000$

ヘキソサミン数： $7 \pm 1$  / 分子量 $5,000$

KDO数： $1 \sim 2$  / 分子量 $5,000$

【請求項6】 次の物性を示す、請求項3記載の細菌に由来するLPS。

主要分子量： $6,500 \pm 2,500$  (SDS-PAGE法による)

リン数： $2 \pm 1$  / 分子量 $5,000$

ヘキソサミン数： $5 \pm 1$  / 分子量 $5,000$

KDO数： $2 \pm 1$  / 分子量 $5,000$

【請求項7】 請求項4～6のいずれかの項に記載のLPS及びそれらの混合物からなる群から選択されるLPSを含む免疫機能活性化剤。

【請求項8】 請求項4～6のいずれかの項に記載のLPS及びそれらの混合物からなる群から選択されるLPSを含む鎮痛剤。

【請求項9】 請求項4～6のいずれかの項に記載のLPS及びそれらの混合物からなる群から選択されるLPSを含む抗禁断症状剤。

【請求項10】 請求項4～6のいずれかの項に記載のLPS及びそれらの混合物からなる群から選択されるLPSを含む動物用免疫機能活性化剤。

【請求項11】 請求項4～6のいずれかの項に記載のLPS及びそれらの混合物からなる群から選択されるLPSを含む動物用鎮痛剤。

【請求項12】 請求項4～6のいずれかの項に記載のLPS及びそれらの混合物からなる群から選択されるL

LPSを含む動物用抗禁断症状剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、新規なLPS產生菌、新規なLPS、新規なLPSを含む医薬及び動物薬に関する。より詳細には、本発明は、LPSを产生する3種の新規なブドウ糖発酵性的グラム陰性短桿菌、それに由来する新規なLPS、及びそれらLPSを含む新規な免疫機能活性化剤、鎮痛剤、及び抗禁断症状剤、及び動物用の新規な免疫機能活性化剤、鎮痛剤、抗禁断症状剤に関する。

【0002】

【從來の技術】 生体には、生体の内部環境が外因性及び内因性の異物によって攪乱されるのを防ぎ、生体の恒常性を維持するための免疫機能が備わっている。従って、免疫機能の低下は健康の悪化、各種疾病的発病、老化促進の原因となり、その活性化は健康向上、各種疾病的発病阻止、治療、老化防止につながる。このため、免疫機能を活性化させる物質の提供が要請されており、現在、

PSK [別名クレステイン (呉羽化学株式会社の登録商標)]、レンチナン (味の素株式会社の登録商標)、ベスタチン (日本化薬株式会社の登録商標)、ソニフィラン (科研製薬株式会社の登録商標)、OK-432 [キャンサー ケモセラビーレポートゥバートゥ 1 (Cancer Chemotherapy Reports Part 1)、Vol. 58、No. 1、10頁(1972)、別名ビスピニール (中外製薬株式会社の登録商標)] 等が知られている。

【0003】 鎮痛剤は麻薬系鎮痛剤と非麻薬系鎮痛剤とに大別される。麻薬系鎮痛剤は、麻薬であることからして、投与に際しては最大限の注意が必要とされている。(昭和56年に株式会社メカルフレンド社が発行した「痛みの臨床」の70～74頁)

一方、非麻薬系鎮痛剤の鎮痛作用は一般に麻薬系に比べて弱く、非習慣性であることが特徴であるが、長期使用においては耐性、依存性がみられるなど、薬理学的には麻薬系鎮痛剤と全く同様に取り扱われるべき薬剤であると考えるべきとされている。(前掲「痛みの臨床」の74頁)

【0004】 アルコール、モルフィン系麻薬、ニコチン等の使用が習慣性になった場合にそれらの摂取を突然禁じると、いわゆる禁断症状が発生することは一般にもよく知られている。そのため、アルコール等の耽溺者の社会復帰が妨げられ、又、臨床での麻薬の使用が制限されていることも周知の事実である。かかる禁断症状を抑制する薬剤としては、現在、メサドン (methadone)、クロニジン (clonidine)、デゾジルピン (diazepam) 等が知られている。しかし、メサドンはそれ自身が薬物依存性を惹起すると言われている。[ビー. アー. ドウヘルティ (P. R. D

ougherty) 等著、ニューヨーファーマコロジー (Neuropharmacology)、26、1595~1600頁、1987年]。又、クロニジンは、0.16mg/kgの腹腔内投与で震頭を抑制すると報告されている。[スチュアート フィールディング (Stuart Fielding) 等著、ザ ジャーナル オブファーマコロジー アンド イクスペリメンタル セラピューティクス (THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS)、vol. 207、No. 7、899~905頁、1978年]。しかし、本発明者らが0.1~1.0mg/kgを静脈内投与しても、より重篤な禁断症状である跳躍現象を抑制する効果はなかった。更に、1.0mg/kgの静脈内投与で痙攣を起こした。デイソルビンは、毒性値と有効値との差が極めて小さいため、安全性に欠ける。[ケイス エー (Keith A.) 等著、サイエンス (Science)、251、85~87頁、1991年]。

〔0005〕

【発明が解決しようとする課題】従来の免疫機能活性化剤のうちで、PSK、レンチナン、ペスタチン、ソニフィランはTNF産生能がないので、それらの免疫機能活性化能は低い。一方、OK-432にはTNF産生能があるが、大量投与が必要であることから、発熱、悪寒、血圧低下、血小板減少等の副作用の発生が避けられず、従って化学療法係数が小さい。更に、簡便な経口投与や経皮投与では効果がないので、投与上の便宜に欠ける。ここで、「TNF」とは、マクロファージにより產生される腫瘍障害因子 (Tumor Necrosis Factor) の総称 [ザ ジャーナル オブバイオロジカル ケミストリー (The Journal of Biol. Chem.)、260、2345~2354頁 (1985年)] であり、マクロファージの活性が高まるにつれてその產生量は増していく。「マクロファージ」は、免疫担当細胞の一一種であり、動物体内のほとんど

小麦粉の名称
①ダーク・ノサン・スプリングス
②1・カナディアン・ホワイト
③ハード・レッド・ワインター・セミハード
④オーストラリアン・スタンダード・ホワイト
⑤ホロシリ

## 〔0011〕LPSの分離

上記細菌から本発明のLPSを分離するには、ウェストファル (Westphal) 等が「メソッズ イン カーボハイドレート ケミストリー (Methods in Carbohydrate Chemistry)」の vol. V [米国ニューヨークのアカデミック プレス (Academic Press) 社が1965年に発行] の83頁に記載した熱フェノール法を用い、更に、陰イオン交換樹脂で精製すればよい。即ち、菌体を

\* 全ての組織に分布し、粒子状の異物や体内の老廃細胞などを捕食して消化する大型のアーベバ状細胞の総称である。「化学療法係数」は、薬剤に対する宿主の最大耐量と病原菌に対する薬剤の最小有効濃度の比をいい、この値が大きい程すぐれた化学療法剤とされる。

〔0006〕又、現在使用されている鎮痛剤には前記の通り欠点があり、未だ満足すべきものは提供されていない。特に、慢性痛に対する鎮痛剤として、安全性が高く、副作用がなく、安価で投与方法が簡単な薬剤の開発が強く期待されている。

〔0007〕更に、前記通り、未だ満足すべき抗禁断症状剤は提供されていない。

〔0008〕本発明は、前記各従来技術の諸欠点が解消された新規な免疫機能活性化剤、鎮痛剤、及び抗禁断症状剤、及び動物用の新規な免疫機能活性化剤、鎮痛剤、抗禁断症状剤を提供すること、それらの活性成分である新規LPSを提供すること、及びそれらLPSを产生する新規細菌を提供することを技術的課題とするものである。

## 〔0009〕

【課題を解決するための手段】前記技術的課題は、高い免疫機能活性化能、鎮痛効果、抗禁断症状効果を有し、化学療法係数が高く、長期使用が可能であり、経口、経皮、注射のいずれの経路でも投与可能であり、しかも、生産コストが安く、大量に供給可能な新規なLPSを提供すること、及びそれらLPSの供給源となる新規な細菌を提供することにより達成される。

## 〔0010〕細菌分離

本発明の3種の細菌は、本発明者等が検討した小麦から30はその産地、種類を問わず分離されている。従って、いずれの産地、種類の小麦及びその加工品からも分離されると推定される。本発明者等がそれら3種の細菌を分離できることを確認した小麦粉の産地、種類は次の通りである。

产地
米国
カナダ
米国
オーストラリア
日本

蒸留水に懸濁した後、蒸留水と等容量の熱フェノールと共に攪拌し、次いで、遠心分離により水層を回収し、この水層を透析に付してフェノールを除去し、限外通過により濃縮して粗LPS画分を得、この画分を常法に従い、例えば、ファルマシア社製のモノQ-セファロース (Sephadex Q-10)、Q-セファロース (Sephadex G-25) を使用して陰イオン交換クロマトグラフィーに付して精製し、更に、常法に従って脱塩すればよい。以上の操作に

より、純度96%以上の精製標品が得られる。

#### 【0012】LPSの物性

追って実施例中で詳述する如く、本発明の3種のLPS(96%以上純度標品)の物性は次の通りであった。

(SDS-PAGE法は実施例1で定義する)

①LPS1 主要分子量: 5,000±1,000 (SDS-PAGE法)

リソ数: 2±1/分子量5,000

ヘキソサミン数: 9±1/分子量5,000

KDO数: 2±1/分子量5,000

②LPS2 主要分子量: 6,500±2,500 (SDS-PAGE法)

リソ数: 1~2/分子量5,000

ヘキソサミン数: 7±1/分子量5,000

KDO数: 1~2/分子量5,000

③LPS3 主要分子量: 6,500±2,500 (SDS-PAGE法)

リソ数: 2±1/分子量5,000

ヘキソサミン数: 5±1/分子量5,000

KDO数: 2±1/分子量5,000

#### 【0013】提供の形態

本発明のLPSはそのまま、或いは任意の程度に濃縮した形で提供できる。又、保存性を高めるために、凍結乾燥や噴霧乾燥などの任意の手段により乾燥粉末として提供することもできる。これらはいずれも常法で生産できる。

#### 【0014】免疫活性化能の測定

本発明のLPSの免疫活性化能は、マクロファージ活性を通じての内因性TNF産生能により確認した。動物体内にTNFを産生させるためには、産生前駆(ブライミング)段階と産生開始(トリガリング)段階が必要であることは、カーズウェル(Carrawall)らにより、ブロシーディングオブナショナルアカデミーサイエンスオブユースエー(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)、72、3666~3670頁(1975年)に報告されており、その後、各段階で使用出来る薬剤の検討もすすめられている。ブライミング段階開始のために投与される薬剤が「ブライマー」(内因性TNF産生促進剤)であり、トリガリング段階開始のために投与される薬剤が「トリガー」(内因性TNF産生剤)である。TNF活性は、L-929細胞[ブロシーディングオブナショナルアカデミーサイエンスオブユースエー-72、3666~3670頁]に対する細胞毒性を基にして、次のようにして測定する。L-929細胞を、5%仔牛胎児血清を加えたイグルミニマムエッセンシャル培地(以下、MEM培地と表す)で育成し、 $8 \times 10^4$ 個の細胞が100μlの同上培地に含まれる様にし、96穴の平底プレートで育種する。育種条件は37°C、2時間、5%CO<sub>2</sub>、100%H<sub>2</sub>Oであり、通常の細胞培養に用いら

れる方法でよい。その後、アクチノマイシンDを培地中に終濃度1μg/mlとなるように加え、培養液の液量を150μlとする。即座に、検体を適当にMEM培地で稀釈したものと50μl加える(この際稀釈率を適宜調製し、ED<sub>50</sub>を求める事ができる)。更に、最終液量200μlとなったL-929細胞を上記条件で18時間培養する。細胞障害活性を測定するには、まず全培地を除去し、ついで0.1%クリスタルバイオレットを含む1%メチルアルコール溶液を加えて固定染色する。

- クリスタルバイオレットは全有核細胞を染色するが、死細胞は染色後にプレート底面より水洗で除去されるので、生存細胞の結果から細胞障害活性を直接測定できる。この染色度をOD(590nm)での吸光度を指標として測定し、対照群に対する染色度と比較する事で細胞障害活性を測定する。活性の定義は次の様に行う。L-929細胞が50%生存できる検体の稀釈率(N)を求める。対照としてウサギTNS〔腫瘍障害血清(Tumor Necrosis Serum)〕を使用し、このウサギTNSの活性n(単位/ml)を $2.4 \times 10^6$ 単位/ $\text{mg}/\text{ml}$ のTNF-αを用いて決定する。このウサギTNSのED<sub>50</sub>を与える稀釈率(C)を求める。検体活性(単位/ml)は $N/C \times n$ で計算する。

#### 【0015】鎮痛効果の測定

本発明のLPSの鎮痛効果は、非麻薬系鎮痛剤検定法の1つとして確立されている「酢酸-ライジング(Wrighting)法」(1982年に医薬出版社株式会社から発行された「炎症と抗炎症療法」の415頁)による動物実験により確認した。

#### 【0016】抗禁断症状効果の測定

- 本発明のLPSの抗禁断症状効果は、モルフィン耽溺性マウスにモルフィン拮抗剤として知られているナロキソン[前掲のザジャーナルオブファーマコロジー・アンド・イクスペリメンタルセラピューティクスの901頁に掲載されている。又、米国のエンドラブズ社(Endo Labs. Inc.)より入手できる]を投与すると誘発される禁断症状のうち最も重篤と思われる「跳躍」現象の発生回数の減少度を指標として確認した。

- 【0017】本発明のLPSは各別に使用できることはもちろん、その意図される用途が阻害されない限り、それらの2種以上を任意に組み合わせて、或いは、更には、他のいずれの物質とも組み合わせて使用できる。又、免疫機能検査薬、動物用免疫機能検査薬、医薬部外品、化粧品、食品、機能性食品、飲料、飼料等として、或いはその一成分としても用いることができる。本発明のLPSを含む免疫機能活性化剤等のいずれもが常法の製剤技術や動物薬製造の常法により、経口薬として、或いは静注薬、筋注薬、經皮薬として単独で、或いは他薬との配合物として、散剤、顆粒剤、丸剤、錠剤、トローチ剤、カプセル剤、液剤、貼付剤、軟膏剤、リニメン

ト剤、ローション剤、坐剤、注射剤等の形態で提供できる。特に、皮膚にはマクロファージが多いので、皮膚塗布剤として投与するとより高い効果が得られる。又、動物用としては、更に、飼料添加剤、プレミックス製剤、飲水添加剤として調製することもできる。飼料添加剤とする場合には、粉剤か顆粒剤とすることが好ましい。なお、プレミックス製剤とは、飼料との混合を容易にするために澱粉などの飼料成分で希釈されたものを指す。本発明のLPSを含む飼料添加剤、プレミックス製剤を添加できる飼料は市販されている飼料のいずれでもよい。又、ミネラル、ビタミン、アミノ酸等の飼料添加物を含む飼料であってもよい。これら製剤には、所望ならば、保存性、均質性を保持するために、常法に従って、賦形剤、保存剤、緩衝剤等の添加剤を加えることもできる。更に、防腐剤、着色剤を含めることもできる。賦形剤としては、例えば、乳糖、デンプンを使用できる。保存剤としては、例えば、バラオキシ安息香酸メチル、バラオキシ安息香酸エチル、バラオキシ安息香酸ブロビル等のバラオキシ安息香酸エステル類、デヒドロ酢酸ナトリウム、フェノール、メチルパラベン、エチルパラベン、ブロピルパラベン等を使用できる。緩衝剤としては、例えば、クエン酸塩、酢酸塩、リン酸塩等が使用できる。以下、実施例、製造例、実験例により、本発明を更に詳細に説明する。なお、それらで使用された「大腸菌LPS」は、米国ディフコ(Difco)社製O1 28:B8である。

#### [0018] 実施例1

① 50 ml 容コーンシングルチューブに、1. 09%の灰分を含む硬質小麦粉(カナダ産の1・カナディアン・ホイート)1. 04 g を秤量して入れ、20 ml の蒸留水を加えて50 mg/ml の小麦粉液を調製した。

② この液を37°Cの水浴中で振とう培養し、経過時間0時、1時、2時、3時、4時、6時、8時、10時、12時、20時、24時、45時に各0. 5 ml を採取し、10°～10°倍希釈して標準寒天培地(日本製薬社製培地であり、下記の組成を持つ)に100 μl 穴をまき込み、生菌数の測定、コロニーの観察を行った。

標準寒天培地(日本製薬社コード番号: 05618)

1リットル中	酵母エキス	2. 5 g
ペプトン	5. 0 g	
ブドウ糖	1. 0 g	
カントン	15. 0 g	
pH	7. 1±0. 1	

③種類が異なると考えられた、培養経過時間8時間目、10時間目に認められた黄へクリーム色不透明コロニー(コロニー1)、クリーム色不透明コロニー(コロニー2)、黄色半透明コロニー(コロニー3)、乳白色不透明コロニー(コロニー4)、白色不透明な小さなコロニー(コロニー5)を上記と同種の別の標準寒天培地にまき、植え継ぎ、一方で、コロニー1～5の細菌のグラム

染色性、リムラス活性を調べた。ここで「リムラス活性」とは、1968年にレヴィン(Levin)により創案された、カブトガニ血球抽出液と発色合成基質を用いたエンドトキシン定量法であるリムラステストで陽性を示すことをさす。このリムラステストはLPS検出法として知られており、例えば、生化学工業株式会社からトキシカラーシステムという名称で市販されている試薬セットを使用して実施できる。上記コロニーのうち、コロニー4及びコロニー5(共にグラム染色性+)のリムラス活性はコロニー1～3(共にグラム染色性-)に比べて極めて低かったので、以後の検討から除き、日本製薬社製の培地及びIDテスト・E B-20を使用し、コロニー1～3の形態、生化学的性状を観察した。次の結果が得られた。

[0019] コロニー1を形成する細菌(識別番号: 900814-1)

(通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に平成2年8月17日から微工研菌寄第11664号として国内寄託され、平成3年8月12日より微工研菌寄第3509号としてブダペスト条約に従った国際寄託に移管された)以下に記載する形態、生化学的性状に基づき、本細菌は腸内細菌科のセラチア属に属すると推定される。

(a) 形態

①短桿状

②運動性なし

③グラム染色性: -

(b) 生育状態

①標準寒天培地: 黄へクリーム色で丸形の不透明なコロニーを形成する。

②SS寒天培地: 白色で半透明なコロニーを形成する。

[SS寒天培地: 日本製薬社コード番号: 05031]

組成1リットル中 肉エキス 5. 0 g

胆汁酸塩 9. 0 g

ペプトン 7. 5 g

ラクトース 10. 0 g

クエン酸ナトリウム 8. 5 g

チオ硫酸ナトリウム 5. 5 g

クエン酸第二鉄 1. 0 g

ニュートラルレッド 0. 025 g

ブリリアントグリーン 0. 033 g

カンテン 13. 5 g

pH: 7. 1±0. 1

③TSI寒天培地: 斜面部での変化はないが、高層部は黄変する。ガスを生成する。

[TSI寒天培地: 日本製薬社コード番号: 05103]

組成1リットル中 肉エキス 5. 0 g

NaCl 5. 0 g

ペプトン 15. 0 g

ラクトース 10. 0 g

	11
ショクロース	10.0 g
ブドウ糖	1.0 g
クエン酸第二鉄	0.2 g
チオ硫酸ナトリウム	0.2 g
フェノールレッド	0.02 g
カンテン	15.0 g
pH	7.6 ± 0.1
(c) 生理的性質	
①フォーグス・プロスカウエル反応	+
②インドールの生成	-
③硫化水素の生成	-
④クエン酸の利用	+
⑤ウレアーゼ	-
⑥オキシダーゼ	-
⑦O-F テスト	+
(d) 炭素源の利用性	
①ラクトース	+
②アドニット	-
③ラムノース	+
④マンニット	+
⑤エスクリン	+
⑥イノシット	-
⑦ソルビット	+
⑧アラビノース	+
⑨ラフィノース	+
▲10▼ショクロース	+
(e) その他	
①リジンの脱炭酸反応	-
②マロン酸の利用	-
③アルギニンの分解	-
④フェニルアラニンの脱アミノ化反応	-
⑤オルニチンの脱炭酸反応	-
[0020]コロニー-2を形成する細菌	(識別番号: 900814-2)
(通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に平成2年8月17日から微工研寄第11666号として国内寄託され、平成3年8月12日より微工研条寄第3510号としてブダペスト条約に従った国際寄託に移管された)	
以下に記載する形態、生化学的性状に基づき、本細菌は腸内細菌科のエンテロバクター属に属すると推定される。	
(a) 形態	
①短桿状	
②運動性なし	
③グラム染色性	-
(b) 生育状態	
①標準寒天培地	クリーム色で不透明なコロニーを形成する。
②S S寒天培地	赤色で不透明なコロニーを形成する。

(7) 12

③T S I 寒天培地：斜面部での変化はないが、高層部は黄変する。ガスを生成する。

(c) 生理的性質

①フォーグス・プロスカウエル反応：+

②インドールの生成：-

③硫化水素の生成：-

④クエン酸の利用：+

⑤ウレアーゼ：-

⑥オキシダーゼ：-

10 ⑦O-F テスト：+

(d) 炭素源の利用性

①ラクトース：+

②アドニット：-

③ラムノース：+

④マンニット：+

⑤エスクリン：+

⑥イノシット：-

⑦ソルビット：+

⑧アラビノース：+

20 ⑨ラフィノース：+

▲10▼ショクロース：+

(e) その他

①リジンの脱炭酸反応：-

②マロン酸の利用：+

③アルギニンの分解：+

④フェニルアラニンの脱アミノ化反応：-

⑤オルニチンの脱炭酸反応：+

[0021]コロニー-3を形成する細菌 (識別番号: 900814-3)

30 (通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所に平成2年8月17日から微工研寄第11666号として国内寄託され、平成3年8月12日より微工研条寄第3511号としてブダペスト条約に従った国際寄託に移管された)

以下に記載する形態、生化学的性状に基づき、本細菌は腸内細菌科のバントエア属に属すると推定される。

(a) 形態

①短桿状

②運動性なし

③グラム染色性：-

(b) 生育状態

①標準寒天培地：黄色で丸形の半透明なコロニーを形成する。

②S S寒天培地：コロニーを形成しない。

③T S I 寒天培地：斜面部での変化はないが、高層部は黄変する。ガスを生成しない。

(c) 生理的性質

①フォーグス・プロスカウエル反応：+

②インドールの生成：-

③硫化水素の生成：-

50

- ④クエン酸の利用：+
- ⑤ウレアーゼ：-
- ⑥オキシダーゼ：-
- ⑦O-F テスト：+
- (d) 炭素源の利用性
- ①ラクトース：+
- ②アドニット：-
- ③ラムノース：+
- ④マンニット：+
- ⑤エスクリン：+
- ⑥イノシット：-
- ⑦ソルビット：+
- ⑧アラビノース：+
- ⑨ラフィノース：-
- ▲10▼ショクロース：+
- (e) その他
- ①リジンの脱炭酸反応：-
- ②マロン酸の利用：+
- ③アルギニンの分解：-
- ④フェニルアラニンの脱アミノ化反応：-
- ⑤オルニチンの脱炭酸反応：-

[0022] ④コロニー1、2、3をそれぞれ1リットルのL-肉汁培地に移し、37°Cで一夜振とうし、5,000G、4°Cで20分間遠心処理して集菌した。なお、このL-肉汁培地は、ディフコ(Difco)社のボリペプトン10g、同社の酵母エキス5g、和光純薬社の特級NaCl(5g)を蒸留水に入れ、NaOHでpH7.5に合わせ、オートクレーブし、別途、予め調製済みの和光純薬社の特級グルコースの40%溶液を400倍に希釈して加えて調製したものである。

⑤各菌体をそれぞれ50mlの蒸留水に懸濁し、これに50mlの90%熱フェノールを加えて65~70°Cで20分間攪拌し、冷却後に、10,000G、4°Cで\*

$$\text{純度} = \frac{\text{乾燥収量} - (\text{蛋白量} + \text{核酸量})}{\text{乾燥収量}} \times 100$$

[0024]

[表1]

#### 菌体900814-1

総乾燥収量 (mg)	6.8	40
LPS (mg)	19.8	
糖 (mg)	3.1	
蛋白 (μg)	86	
核酸 (μg)	<161	
純度 (%)	96<	

\* 20分間遠心処理して、水層を回収した。フェノール層を更に2回上記と同一の操作に付した。3つの水層を合わせ、一夜透析してフェノールを除去し、内液を、アドヴァンティック・トヨー(ADVANTEC TOY O)社のUK-200を使用して限外通過に付して分子量20万カットオフにより濃縮した(N<sub>2</sub>圧: 2気圧)。

⑥Cの濃縮サンプルを、ファルマシア社製のQ-セファロース ファストフロー(Q-Sepharose Fast Flow)を使って陰イオン交換クロマトグラフィーに付した。即ち、10mMトリス-HCl(pH 7.5)と10mMのNaClを含む緩衝液で試料をカラムに付した後、400mM NaCl/10mMトリス-HCl(pH 7.5)でリムラス活性画分を溶出させた。この溶出液を上記と同じ条件で限外通過に付して脱塩、濃縮して、純度96%以上のLPSを得た。なお、核酸は1M NaCl/10mMトリス-HCl(pH 7.5)で溶出した。

[0023] 各菌体の結果は次表1~3の通りであった。なお、LPS量は、リムラステストによる大腸菌LPS換算値であり、糖はフェノール-硫酸法【エム・デュボイス(M·Dubois)等著、アナリティカルケミストリー(Aanalytical Chemistry), vol. 28, 350頁、1956年】、蛋白はローリー法【オー、エイチ、ローリー(O. H. Lowry)等著、ジャーナルオブバイオロジカルケミストリー(Journal of Biological Chemistry), Vol. 193, 65頁、1951年】で測定した。又、核酸量はOD(260nm)での測定値に基づき(1OD=50μg)、純度(%)は次式に基づき計算した。  
【数1】

#### 菌体900814-2

総乾燥収量 (mg)	10.4
LPS (mg)	75.6
糖 (mg)	2.5
蛋白 (μg)	64
核酸 (μg)	<108
純度 (%)	98<

[表3]

[表2]

菌体900814-3

總乾燥収量 (mg)	19.2
LPS (mg)	103.6
糖 (mg)	7.6
蛋白 ( $\mu g$ )	73
核酸 ( $\mu g$ )	< 137
純度 (%)	99 <

## [0025] ⑥分子量

各菌体から得られたLPSを各々蒸留水に溶解して2m g/m l溶液を調製し、その10  $\mu l$ を1.5m l容プラスチックチューブに入れた。これに、別途、1.80  $\mu l$ の10% (w/v) SDS、4.5  $\mu l$ の5%β-メルカプトエタノール、9.0  $\mu l$ のCB B色素溶液、11.2.5  $\mu l$ の0.5Mトリス塩酸(pH6.8)及び2.5  $\mu l$ の蒸留水を加えて調製したSDS処理液10  $\mu l$ を加えてよく混合し、次いで5分間沸騰水浴中に浸した。この加熱後直ちに氷水中に浸して急冷した。1.0 m lの10% (w/v) SDS、1.7.9 gのトリシン及び3.03 gのトリスを1リットルの蒸留水に溶解して調製した泳動緩衝液をマリソル社製のスラブゲル電気泳動槽に入れた。20%ボリアクリルアミドゲルを泳動槽に固定し、サンプル溝に検体を入れ、電圧を50vに1時間、次いで、150vに固定して、色素がゲルより溶出するまで泳動を続行した(本明細書でのこの泳動法をSDS-PAGE法と称する)。泳動終了後に、バイオラッド社の銀染色キット161-0443を使い銀染色を室温で行って、挙動を確認した。同時に泳動させた蛋白分子量マーカー〔ファルマシア社製のLMWキットE:ホスホリラーゼb (9.4k)、アルブミン (8.7k)、オブアルブミン (4.3k)、カーポニックアンヒドライゼ (30k)、トリプシンインヒビター (20k)、 $\alpha$ -ラクトアルブミン (14k)〕、ペプチド分子量マーカー〔ファルマシア社製の1860-101分子量マーカー:ミオグロビン (16.9k)、ミオグロビンI&II (14.4k)、ミオグロビンI (8.2k)、ミオグロビンII (6.0k)、ミオグロビンIV (2.5k)〕の泳動位置から本発明のLPSの分子量を計算したら、 $5.000 \pm 1.000$  (菌体900814-1に由来するLPS1)、 $6.500 \pm 2.500$  (菌体900814-2に由来するLPS2)及び菌体900814-3に由来するLPS3)であった。同様にして測定された大腸菌LPS (ディフコ社製の大腸菌O127:B8LPS) の分子量は $30.000 \pm 20.00$  0であった。上記銀染色におけるLPS1、LPS2、

LPS3の染色帯を図1に示す。図1において、番号1がLPS1の、番号2がLPS2の、番号3がLPS3の染色帯である。図1に示されるように、LPS1は分子量3万付近にもややまとった染色帯を示した。LPS2は30,000から43,000の間に染色帯が認められるが、14,000以下の染色帯の染色度を比較すると、高分子のものは極めて少ないと推定される。後述する糖量、ヘキソサミン量から判断してもLPS2は最も糖含有率が低く、ついでLPS3、LPS1の順で高くなり、電気泳動で観察されたパターンと一致すると考えられる。又、LPS量/総乾燥収量の比もLPS2、LPS3、LPS1の順に低くなっている。以上の観察結果から、LPS2は比較的低分子のLPSが多く、次いで、LPS3、LPS1の順にその割合は少なくなると推定される。

## [0026] ⑦リン含有量

チェントリバラ (Chen-Toribara) 法  
〔チェン等著、「アナリティカル ケミストリ (Analytical Chemistry)」、vol. 2 20、1756~1758頁 (1956年) に準拠して次の通りに行った。LPS1、LPS2、LPS3を各別に蒸留水に溶解して、それぞれ、31.6  $\mu g$ 、57.6  $\mu g$ 、103.6  $\mu g$ のLPSを含む20  $\mu l$ の溶液を調製し、小試験管に入れた。20  $\mu l$ の50v/v%硫酸を添加し、160°Cで2時間加熱した。次いで、20  $\mu l$ の10v/v%過塩素酸を添加した後にガスバーナーで1分間加熱して灰化させた。その後に0.5m lの蒸留水、次いで0.5m lの反応試薬 (1m lの6N硫酸、2m lの蒸留水、2m lの2.5v/w%モリブデン酸アンモニウム及び1m lの10v/v%のアスコルビン酸を混合して調製し、その0.5m lを使用) を添加して室温で30分間放置した後に、820nmでの吸光度OD (820 nm) を測定した。なお、検量線作成用の試料としては、リン酸二水素カリウム (和光純業社製) を蒸留水で希釈し、リン酸重量としてそれぞれ2.5  $\mu g$ 、1  $\mu g$ 、0.25  $\mu g$ 、0  $\mu g$ を含む0.5m lの溶液を調製して使用した。なお、リン1gはリン酸二水素カリウム4.39gに相当する。結果を次表4に示す。表中、吸光度を示す数値は、無機リンの混入 (例えば、リン酸緩衝液に由来する) による誤差を避けるために、加熱処理をしていない対照のデータを減じた値である。リン量 ( $\mu g$ ) は吸光度から計算された値である。リン量 (重量%) は、次式により計算した。なお、式中の「0.67」は、標準のリン1  $\mu g$ のOD値を指し、サンプル濃度は、蒸留水に溶解した各LPSの濃度 (mg/m l) を指す。

【数2】

$$\text{リン量(重量\%)} = \frac{\text{サンプル吸光度}}{0.67 \times (\text{サンプル濃度}) \times 0.05}$$

リン数は、次式により計算した、分子量5,000当た  
りの換算数である。

【表4】

【数3】

$$\text{リン数} = \frac{\text{リン量(重量\%)}}{100} \times \frac{5,000}{31}$$

\*

LPS	吸光度	リン量(μg)	リン量(重量\%)	リン数
1	0.36	0.54	1.7	2±1
2	0.31	0.46	0.8	1~2
3	0.87	1.30	1.3	2±1

## 【0028】④ヘキソサミン含有量

エルソン-モルガン(Elson-Morgan)法  
(東京化学同人出版「生化学実験講座」No. 4の37  
7~379頁)に準拠して次の通りに行った。LPSを  
蒸留水に溶解して1.58mg(LPS1)、2.88  
mg(LPS2)、5.18mg(LPS3)/mlの溶液を調製し、その100μlをスクリューキャップ付  
きスピツ(イワキガラス社製)に入れ、これに100  
μlの8NHClを添加して110°Cで16時間加熱し  
た。4NNaOHを約2000μl添加してpH7とし  
た。その1000μlを分取し、別のスクリューキャップ  
付きスピツに入れ、2000μlの下記試薬Aを加えた  
後に、105°Cで1.5時間加熱し、次いで冷水で冷却  
した。次いで、1000μlを分取し、670μlの9.6  
%エタノールを加え、更に、67μlの下記試薬Bを加  
えた後に室温で1時間放置し、535nmで吸光度を測  
定した。検量線作製用試料としては0.20~2000  
μg/mlのN-アセチルグルコサミン(和光純薬社  
製)を使った。

(試薬A) 75μlのアセチルアセトンと2.5mlの  
1.25N炭酸ナトリウムを混合して調製した。

(試薬B) 1.6gのp-ジメチルベンズアルデヒドと  
30mlの濃塩酸と30mlの9.6%エタノールを混合  
して調製した。

結果、LPS1、LPS2、LPS3のヘキソサミン数  
は各々9±1/分子量5,000、7±1/分子量5,  
000、5±1/分子量5,000だった。

## 【0029】④KDO含有量

KDO(2-ケト-3-デオキシオクトネート)含有量  
をジフェニルアミン法[シャビール(Shaby  
R.)等著、アナリティカルバイオケム(Analy  
tical Biochem.)、58(1)、123  
~129頁(1974年)]に準拠して次の通りに行つ

た。500mgのジフェニルアミン、5mlのエタノ  
ール、45mlの冰酢酸、50mlの濃塩酸(全て和光純  
薬社製)を合わせてKDO検出試薬を調製した。その5  
00μlに、(1) 0.505mg/mlのLPS1を含む250μl蒸留水溶液；(2) 0.576mg/ml  
のLPS2を含む250μl蒸留水溶液；(3) 0.  
518mg/mlのLPS3を含む250μl蒸留水溶液；のいずれかを合わせ、100°Cの沸騰水浴中で33  
分間加熱後に冷水(24.5°C)中で30分間冷却し、ついで日立分光光度計320を用い420、470、6  
30、650nmでの紫外部吸収を測定した(測定値を  
各々A420、A470、A630、A650とする)。

標準試料としては、0.5μモル/mlのKDO

アンモニウム塩[米国シグマ(Sigma)社製]を含む  
蒸留水250μlを使用した。検体試料、標準試料そ  
れぞれについて、次の値を求めた。

$$S = A420 - A470 + A630 - A650$$

検体試料の値( $S_f$ )はLPS1で0.109、LPS  
2で0.078、LPS3で0.099であった。標準  
試料の値( $S_s$ )は0.246であり、蒸留水のみの値  
は0.005であった。この値の比較により、LPS1  
には2±1/分子量5,000、LPS2には1~2/  
分子量5,000、LPS3には2±1/分子量5,0  
00のKDOが含まれると推定された。なお、これらの  
値は、LPS1を例にとると、次のように計算される。

溶液に含まれるKDOの濃度をx(μモル/ml)とす  
ると、  
【数4】

$$\frac{0.5}{0.246} = \frac{x}{0.109}$$

上記式から、x=0.221となる。従って、LPS1  
の1モル(5,000と仮定)に含まれるKDOのモル

数をyとすると、次式により、 $y = 2.19$ となる。 \* \* [数5]

$$y = x \times 10^{-8} \times \frac{5,000}{0.505 \times 10^{-8}} = 2.19$$

【0030】以下は、本発明のLPSを含む製剤の処方例である。なお、実施例2～5におけるLPS量は、リムラステストによる大腸菌LPS換算量である。

#### 実施例2（錠剤）

LPS 1	0.04 g
6%HPC乳糖	1.78 g
ステアリン酸タルク	8 g
パレイショデンブン	1.4 g

以上を混和し、打錠して、0.1 mgの小麦LPSを含む0.5 gの錠剤400個を調製した。

#### 実施例3（内用液剤）

LPS 1	1 mg
精製水	1000 ml

#### 実施例4（軟膏剤）

LPS 1	0.1 g
精製ラノリン	80 g
黄色ワセリン	適量
1000 g	

#### 実施例5（注射剤）

LPS 1	0.5 mg
注射用蒸留水	適量
合計	1000 ml

#### 【0031】製造例1（百日咳菌LPSの製造）

千葉県血清研究所から入手した試験用百日咳菌液（2.0 × 10<sup>10</sup> 細胞/ml）を死菌体として用いた。上記死菌体を25 mg（乾燥重量）/mlとなるように滅菌水に懸濁した。これに等量の9.0%熱フェノール液（6.8～70°C）を添加し、6.8°Cで1時間振盪しながら抽出した。8.0 0.00 G、4°Cで20分間遠心分離して水層を分取した。残りのフェノール層に、上記水層と等量の滅菌水を加えて同様の抽出を行った。得られた水層を先の水層と合わせて流水中で一晩透析後、ロータリーエバボレーターで1/10に濃縮した。これを8.0 0.0 G、4°Cで20分間遠心分離した。上清を分取し、酢酸ナトリウムを少量加え、0～4°Cの冷エタノールを6倍量加えて-20°Cで一晩放置した。4.0 0.00 G、4°Cで30分間遠心分離して回収した沈殿物をエタノールで2回、次いでアセトンで1回遠心洗浄し、アスピレーターで乾燥させた。残さを、2.0 mg/mlとなるように蒸留水に懸濁し、米国ブランソン（Branson）社製のソニファイア185型で超音波処理（出力コントロール5、15分、室温）に付した。次いで2.500 G、4°Cで10分間遠心分離し、上清を分取した。この上清を4°Cで、米国シグマ（Sigma）社製の核酸分解酵素DNase I、RNase Aで15～16時間処理した（最終的には10 μg/mlのDNase I

- と、2.0 μg/mlのRNase Aを使用した）。更に同じ濃度の核酸分解酵素を加えて37°Cで2時間加温した。次いで2.500 G、4°Cで10分間遠心分離し、上清を分取した。この上清を米国ゲルマン（Gelman）社のアクロディスク（Acrodisc）を使い、孔径0.2 μmで濾過した。濾液を分子篩にかけ  
【樹脂】米国ファルマシア（Pharmacia）社製セファロース（Sephadose）6B、カラムサイズ=内径5 cm × 長さ100 cm、緩衝液=10 mMのトリス-HCl、10 mMのNaCl（pH 7.5）、流速=約3 ml/cm<sup>2</sup>/時）、生化学工業社製のLS-1キットを用いてリムラス活性陽性画分を調べて合わせ、上記ゲルマン社のアクロディスクを使い、孔径0.2 μmで濾過した。濾液をイオン交換にかけ【装置】米国ファルマシア（Pharmacia）社製FPLC、  
20 樹脂：米国ファルマシア社製モノQ HR10/10、緩衝液=10 mMのトリス-HCl+10 mMのNaCl（pH 7.5）で15分洗浄し、次いで、NaCl量を1.65 mMに増加して30分洗浄し、次いで、20分かけて、NaCl量が1.65 mMから1 Mの濃度勾配になるようにNaCl量を増加させながら洗浄し、次いで、1 MのNaCl量で30分洗浄する（流速=2 ml/分）、生化学工業社製のLS-1キットを用いてリムラス活性陽性画分を調べて合わせた。合わせた画分をカラムで脱脂し【樹脂】米国ファルマシア（Pharmacia）社製セファドックスG-25ファイン（fine）、カラムサイズ=内径2 cm × 長さ25 cm、溶出液=蒸留水）、次いで凍結乾燥した。この凍結乾燥標品（4.50 mg）に混入している可能性の最も高い物質は核酸である。そこで、紫外吸収曲線（200～400 nm）をとり、260 nmでの吸光度を求めた。吸光度1のときの核酸濃度が50 μg/mlであることを用いて上記吸光度から核酸濃度を算出した1%以下であった。又、SDS-PAGE法では蛋白質は明確には検出されなかった。従って、検出感度を考慮すると、上記凍結乾燥標品に混入している蛋白質は高々0～3%と推定される。従って、上記凍結乾燥標品の純度は9.6%以上と推定された。実施例1に記載の方法と同様にして測定されたこの百日咳菌LPSの物性は次の通りであった。  
百日咳菌LPSの物性  
主要分子量=6,000±1,000 (SDS-PAGE法による)  
リン数=4/分子量6千  
ヘキソサミン数=12/分子量6千  
脂肪酸数=4/分子量6千  
KDO数=2±1/分子量6千

〔0032〕又、同様にして測定された大腸菌LPSの物性は次の通りであった。

#### 大腸菌LPSの物性

主要分子量=40,000±10,000

8,000±4,000 (SDS-PAGE法による)

リン数=12／分子量3万

ヘキソサミン数=4.5±6／分子量3万

脂肪酸数=18／分子量3万

KDO数=5±1／分子量3万

#### \*〔0033〕実験例1 (免疫機能活性化効果)

各群2匹又は3匹のマウス(7週齢のオスC3H/H e。平均体重2.5g。)の尾静脈に、1匹当たりリムラス活性量で1,10.又は100μgのLPS1,LPS2,LPS3を含む生理的食塩水0.2mlを注射し、その1時間後に血清を採取し、L929細胞に対する毒性に基づいてTNF活性を測定した。結果を、各群2匹又は3匹の平均として表5に示す。なお、表中、( )内はマウスの匹数を表す。

\*10 [表5]

機体	TNF活性 (単位/mI)		
	1 μg	10 μg	100 μg
LPS1	8.15 (3)	25.80 (2)	30.69 (2)
LPS2	1.90 (3)	7.47 (2)	6.57 (2)
LPS3	7.44 (3)	16.19 (2)	34.47 (2)

#### 〔0034〕実験例2 (鎮痛効果)

7~10週齢の各群5匹のC3H/H e雄マウス(平均体重約2.8g)に、LPS換算でそれぞれ0.1、1.5、2.5、4.000μg/匹ずつの本発明のLPS3または大腸菌LPSを含むように調製した200μlの蒸留水をゾンデで経口投与した。その1.5時間後に500μlの※

※0.7%酢酸を5分かけて腹腔内投与し、その後30分間にわたり、各マウスの身もだえ回数を計数し、表6に示す結果が得られた(各群5匹の平均)。表中、「-」は該当量では測定しなかったことを示す。又、「身もだえ阻止率(%)」は、次式により計算した。

[数6]

$$(1 - \frac{\text{各投与量での身もだえ数} - \text{投与量 } 400 \mu\text{g} \text{ での身もだえ数}}{\text{投与量 } 0 \text{ での身もだえ数} - \text{投与量 } 400 \mu\text{g} \text{ での身もだえ数}}) \times 100$$

[表6]

LPS投与量 (μg/匹)	本発明のLPS3		大腸菌LPS	
	身もだえ数	身もだえ阻止率 (%)	身もだえ数	身もだえ阻止率 (%)
	0	18	20	0
1	17	10	18	82
5	10	80	-	-
25	7	110	13	64
400	8	100	9	100

図2は表6に示した結果をグラフ化したものである。図2より、LPS3の身もだえ阻止率ED<sub>50</sub>は2.8μg/匹、大腸菌LPSのそれは17μg/匹と推定された。従って、鎮痛効果に関しては、LPS3は大腸菌LPSの約6倍の効果があると推定される。

#### 〔0035〕実験例3 (抗禁断症候効果-その1)

各群6~12匹の4~5週齢のd d Yマウス(体重2.0~2.4g)に、1.2.7mgのモルフィンペレット(日本の武田製薬工業株式会社から入手した塩酸モルフィンをレキュラーシーブに含浸させて調製した。以下同様である。)を背中の首より少し下の皮下に移植し、その

2日後に50μg/kgの大腸菌LPS(6匹)、LPS3(7匹)又は製造例1で製造された百日咳菌LPS(6匹)を生理的食塩水に溶解して静注した。対照群には生理的食塩水のみを投与した。その1時間後に10mg/kgのナロキソンを腹腔内投与し、その後直後から40分間、マウスの「跳躍」数を計数し、跳躍抑制効果を判定した。結果を表7に示す。表7において、数値は該当するマウスの匹数を表す。なお、跳躍抑制効果は次の通りにして判定した。対照群としての生理的食塩水投与群(12匹)での平均跳躍数/匹が6.2.7±2.5.5だったので、6.2.5-2.5.5=3.7より、跳躍

数37以上は効果なし、37回未満は効果ありと判定した。

【表7】

投与群	跳躍抑制効果	
	あり	なし
生理的食塩水	1	11
LPS3	7	0
大腸菌LPS	3	3
百日咳菌LPS	4	2

表7に明らかな通り、抗禁断症状発現率は、対照群でわずか約8%なのに、大腸菌LPS投与群で50%、百日咳菌LPS投与群で約67%、LPS3投与群で100%\*

LPS3投与量 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	0	0.5	5	15	50	500
跳躍数	69.5	36.8	42.0	16.1	20.5	11.5

図3は表8に示した結果をグラフ化したものである。

#### 【0037】実験例5（抗禁断症状効果－その3）

本発明のLPSの抗禁断症状効果の皮内投与における用量依存性を調べるために、実験例4を繰り返した。ただし、LPS3の量は $50\mu\text{g}/\text{kg}$ （7匹）又は $500\mu\text{g}/\text{kg}$ （7匹）

投与群	生理的食塩水	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群		500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群	
		跳躍数	平均	跳躍数	平均
		84.7	44	19.8	19.8

図4は表9に示した結果をグラフ化したものである。図3及び図4より、本発明のLPSの抗禁断症状効果は用量に依存することが明白である。

#### 【0038】実験例6（抗禁断症状効果－その4）

本発明のLPSの抗禁断症状効果の投与時期依存性を調べるために、各群5～9匹の4～5週齢のd d Y雄マウス（体重2.0～2.4 g）に、12.7 mgのモルフィンペレットを背中の首より少し下の皮下に移植し、その2日★

LPS投与時期	投与せず	1時間前	3時間前	8時間前	18時間前
跳躍数	65.1	2.7	25.1	33.7	54.6

図5は表10に示した結果をグラフ化したものである。図5より、本発明のLPSには禁断症状予防効果があること、そしてその予防効果は禁断症状発現の直前に投与すると最大限に発揮されることが推定される。

#### 【0039】投与量、投与間隔、毒性値

本発明のLPSを免疫機能活性化剤、鎮痛剤或いは抗禁断症状剤として、或いは、動物用の免疫機能活性化剤、

\* %であった。

#### 【0036】実験例4（抗禁断症状効果－その2）

本発明のLPSの抗禁断症状効果の静脈投与における用量依存性を調べるために、4～5週齢のd d Y雄マウス（平均体重2.0 g）に、12.7 mgのモルフィンペレットを背中の首より少し下の皮下に移植し、その2日後に $0.5\mu\text{g}/\text{kg}$ （6匹）、 $5\mu\text{g}/\text{kg}$ （6匹）、 $15\mu\text{g}/\text{kg}$ （9匹）、 $50\mu\text{g}/\text{kg}$ （12匹）、又は $500\mu\text{g}/\text{kg}$ （6匹）のLPS3を生理的食塩水に溶解して静脈内投与した。対照群（10匹）には生理的食塩水のみを投与した。その2時間後に $10\text{mg}/\text{kg}$ のナロキソンを腹腔内投与し、その後から40分間、マウスの「跳躍」数を計数した。結果を各群の1匹当たりの平均として表8に示す。

【表8】

※  $\mu\text{g}/\text{kg}$ （5匹）とし、対照群（生理的食塩水投与群）は8匹とした。結果を各群の1匹当たりの平均として表9に示す。

【表9】

★後に $10\text{mg}/\text{kg}$ のナロキソンを腹腔内投与し、但し、ナロキソン投与の1時間前（7匹）、3時間前（8匹）、8時間前（6匹）、18時間前（5匹）に $50\mu\text{g}/\text{kg}$ 匹のLPS3を静脈内投与し、ナロキソン投与直後から40分間、マウスの「跳躍」数を計数した。なお、LPS3無投与群は9匹であった。結果を各群1匹当たりの平均として表10に示す。

【表10】

鎮痛剤或いは抗禁断症状剤として投与するさいの量、投与間隔は、当然、担当医師或いは獣医師の厳重な管理下、投与対象の年齢、症状、体重、投与効果を勘案して個別に決定されるが、人間の成人（60 kg）で、経口投与で $1\mu\text{g} \sim 100\text{mg}$ 、静脈投与で $10\text{ng} \sim 10\text{mg}$ 、経皮投与で $100\text{ng} \sim 1\text{mg}$ が1日1回の投与量の一応の目安となる。なお、動物では、牛、馬等の大

型動物は上記の量の60分の1を体重1kg当たりの量の目安とし、豚、犬、猫等の中型、小型の動物ではその2倍量を体重1kg当たりの量の目安とし、鶏等の鳥類では更にその2倍量を体重1kg当たりの量の目安とし投与できる。なお、ベーレンス ケルバー (Behre n s K [外1])

a

法により測定した、7週齢の平均体重22gのC3H/He雄マウスにおけるLPS1、LPS2、LPS3のLD<sub>50</sub>はそれぞれ150、180、180μg/匹であり、大腸菌LPSの値300μg/匹の6%以下であった。又、大腸菌LPS、百日咳菌LPS(製剤例1)の毒性値LD<sub>50</sub>。(1群2匹の雄BALB/Cマウス、平均体重4.5g、における平均値)は静脈内投与でそれぞれ3.4、1.1mg/kgであり、皮内投与でそれぞれ1.6、3.2mg/kgだった。

【0040】

【発明の効果】本発明により新規な細菌、それに由来する新規なLPS、及びそれを含む新規な免疫機能活性化剤、鎮痛剤、抗禁断症状剤、動物用の免疫機能活性化 \*

\*剤、鎮痛剤、抗禁断症状剤が提供される。又、本発明のLPSは、常法により容易に医薬、動物薬、検査薬、医薬部外品、化粧品、食品、機能性食品、飲料、飼料その他の主成分として或は一成分として配合することができる。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のLPSの、SDS-PAGE法におけるパターンを示す図である。

【図2】本発明のLPSの鎮痛効果を、大腸菌LPSとの対比で示すグラフである。

【図3】本発明のLPSの抗禁断症状効果の静脈内投与における用量依存性を示すグラフである。

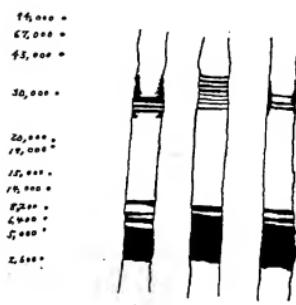
【図4】本発明のLPSの抗禁断症状効果の皮内投与における用量依存性を示すグラフである。

【図5】本発明のLPSの抗禁断症状予防効果の投与時期依存性を示すグラフである。

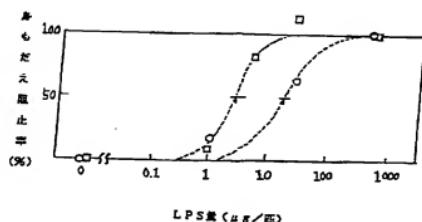
## 【符号の説明】

図1において、1はLPS1の、2はLPS2の、3はLPS3のパターンを示す。図2において、□は本発明のLPSの、○は大腸菌LPSのデータを示す。

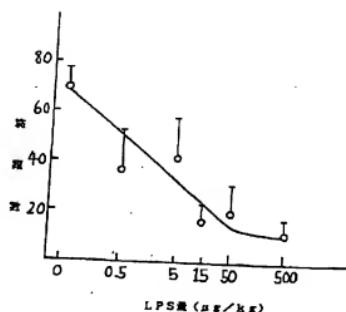
【図1】



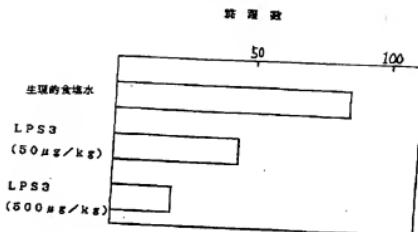
【図2】



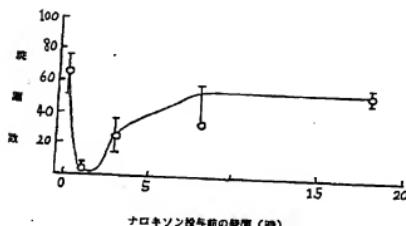
【図3】



【図4】



【図5】



## 【手続補正書】

【提出日】平成4年11月19日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記LPS及びそれらの混合物からなる群から選択されるLPSを含む抗禁断症状剤。

1)次の物性を示すLPS1。

主要分子量:  $5,000 \pm 1,000$  (SDS-PAGE法による)リン数:  $2 \pm 1$ /分子量5,000ヘキソサミン数:  $9 \pm 1$ /分子量5,000\* KDO数:  $2 \pm 1$ /分子量5,000

2)次の物性を示すLPS2。

主要分子量:  $6,500 \pm 2,500$  (SDS-PAGE法による)リン数:  $1 \sim 2$ /分子量5,000ヘキソサミン数:  $7 \pm 1$ /分子量5,000KDO数:  $1 \sim 2$ /分子量5,000

3)次の物性を示すLPS3。

主要分子量:  $6,500 \pm 2,500$  (SDS-PAGE法による)リン数:  $2 \pm 1$ /分子量5,000ヘキソサミン数:  $5 \pm 1$ /分子量5,000KDO数:  $2 \pm 1$ /分子量5,000

フロントページの続き

(51)Int.Cl.\*

A 61 K 37/20

C 08 B 37/00

識別記号

A E R

府内整理番号

F I

P 7329-4C

技術表示箇所

C 1 2 P 19/04 C 7432-4B  
//(C 1 2 N 1/20  
C 1 2 R 1:425)  
(C 1 2 N 1/20  
C 1 2 R 1:01)  
(C 1 2 P 19/04  
C 1 2 R 1:01)

(72)発明者 月岡 大輔  
千葉県千葉市春日 1-21-17  
(72)発明者 水野 伝一  
神奈川県鎌倉市岡本18

(72)発明者 大島 治之  
東京都八王子市館町1097館ヶ丘団地2-1  
- 513